

## MILIEU DE CONSERVATION D'ORGANES, DE TISSUS BIOLOGIQUES OU DE CELLULES VIVANTES

La présente invention concerne le domaine technique de la conservation de cellules vivantes. Plus précisément, l'invention a pour objet un nouveau milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

Dans le domaine des greffes d'organes, lorsqu'un organe est prélevé sur un donneur, en vue d'être greffé sur un receveur, il est nécessaire de posséder un milieu de conservation de l'organe apte à maintenir sa vitalité pour une bonne prise du greffon. En fait, bien souvent, différents milieux sont nécessaires. Dans le cas de cornées humaines notamment, on utilise généralement :

- un milieu de transport pour l'acheminement des cornées du site de prélèvement au centre de culture, d'une part, et du centre de culture au site de la greffe, d'autre part,
- un milieu de conservation. La conservation a lieu, le plus souvent, à 4°C ou 31° C. Ce milieu doit garantir une conservation optimale de la viabilité cellulaire à moyen terme, soit environ 4 à 5 semaines, une sécurité maximale en termes de qualité (contrôle endothélial), de stérilité (contrôles bactériologiques, sérologiques et virologiques), et
- un milieu de déturgescence, utilisé environ 24 heures avant la greffe, afin de réduire l'épaisseur de la cornée et la rendre transparente.

La plupart des milieux utilisés actuellement contiennent des composants d'origine animale : sérum albumine de veau fœtal, protéine d'origine animale de type transferrine, insuline...

Du fait de la présence de composants d'origine animale dans ces milieux, il est difficile d'en garantir la sécurité sanitaire vis-à-vis des maladies à prions, notamment de la maladie de Creutzfeldt Jacob. De plus, ces milieux sont susceptibles d'être contaminés par des agents infectieux et n'ont pas une composition parfaitement reproductible.

Dans ce contexte, la présente invention a pour objectif de fournir un nouveau milieu de conservation préservant la viabilité des cellules vivantes.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un milieu de conservation à faible coût de revient, du fait des composants qu'il contient.

Le milieu de conservation selon la présente invention se doit également de présenter une sécurité maximale en termes de qualité et de stérilité.

5 De plus, il présente l'avantage de pouvoir être préparé à partir de composants entièrement synthétiques, c'est-à-dire issus de la synthèse chimique et recombinante, donc non immunogènes et non contaminés par des agents infectieux. Par conséquent, le milieu de conservation selon l'invention peut présenter une composition définie reproductible d'un lot à l'autre.

10 Plus précisément, l'invention concerne un milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes contenant une base nutritive liquide, caractérisé en ce qu'il contient un acide hyaluronique de haut poids moléculaire et du chlorure de sodium et en ce qu'il ne contient aucun composant d'origine animale.

15 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel milieu pour la conservation, l'organoculture, la culture cellulaire, le transport ou la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes et en particulier de cornées humaines vivantes.

Par organes, cellules ou tissus biologiques vivants, on entend des composants d'origine humaine ou animale comprenant des fibroblastes, des cellules endothéliales  
20 et/ou des cellules épithéliales vivantes.

Le milieu de conservation de l'invention peut être qualifié de produit thérapeutique annexe.

Le milieu de conservation selon l'invention contient des substances viscoélastiques (SVE) destinées à protéger les cellules endothéliales et les tissus  
25 environnants. Ces substances viscoélastiques sont notamment l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire.

L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, c'est-à-dire de poids moléculaire supérieur ou égal à 1 million de Daltons, peut être d'origine animale, extrait de la crête de coq ou du sang de cordon, d'origine bactérienne (de cultures de  
30 streptocoques) ou d'origine végétale. Bien entendu, le milieu de conservation selon l'invention contient de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire d'origine végétale, étant donné qu'il est exempt de tout composant d'origine animale. En

particulier, pour la préparation du milieu de conservation de l'invention, on utilisera de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire issu du blé, sous forme de poudre et vendu sous le nom commercial Cristalhyal ou sous forme de solution aqueuse à 1 % et vendu sous le nom commercial Vitalhyal par le laboratoire Bowman  
5 (distributeur société Soliance), présentant un poids moléculaire supérieur ou égal à  $10^6$  Daltons et une viscosité Brookfield à 20° C de 1 500 centipoises.

Le milieu de conservation selon l'invention contient également du chlorure de sodium, en tant que cristalloïde. Le chlorure de sodium a notamment pour fonction d'éviter la précipitation de l'acide hyaluronique, mais aussi participe au maintien de  
10 l'osmolarité.

En particulier, le milieu de conservation selon l'invention contient :

- de 80 à 4000 mg/l, de préférence 100 à 200 mg/l, préférentiellement de 100 à 160 mg/l d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, et
- de 4500 à 9000 mg/l, de préférence de 5500 à 9000 mg/l,  
15 préférentiellement 7000 mg/l de chlorure de sodium.

De façon avantageuse, le milieu selon l'invention contiendra du poloxamer 188 qui a notamment pour fonction d'augmenter la viscosité du milieu.

Le poloxamer 188, également nommé Pluronic F68 ou Lutrol® F68 est un polymère séquencé de polyoxyéthylène-polyoxypropylène de poids moléculaire  
20 7680-950 g/mol et de formule générale :



où x est environ égal à 79 et y environ égal à 28.

La présence de poloxamer 188 est particulièrement avantageuse dans le milieu selon l'invention, quand ce dernier est destiné à être utilisé pour la déturgescence  
25 d'organes et pour le transport et la conservation, de tissus ou cellules vivantes, et, en particulier, de greffons de cornées humaines. Le milieu selon l'invention contiendra, de préférence, de 200 à 75000 mg/l, préférentiellement de 450 à 50000 mg/l de poloxamer 188.

Les milieux de conservation actuellement sur le marché, destinés à la  
30 déturgescence de cornées contiennent du dextran. Le dextran a pour fonction d'affiner l'épaisseur de la cornée et pourra être utilisé dans les milieux selon l'invention destinés à la déturgescence de cornées. On lui préférera néanmoins le

poloxamer 188 qui a également pour effet d'affiner la cornée mais qui est beaucoup moins cytotoxique.

La méthylcellulose est une autre SVE que peut contenir le milieu de conservation selon l'invention. La méthylcellulose est d'origine végétale et est  
5 obtenue à partir de fibres de cellulose provenant de bourres de coton ou de pulpe de bois. Ces fibres de cellulose sont traitées avec une solution de soude caustique, pour subir une éthérisation avec du chlorure de méthylène. Le degré de substitution, correspondant au nombre de substituants méthoxylés par unité glucosidique est compris entre 1,64 et 1,92. En particulier, on pourra utiliser pour préparer le milieu  
10 de conservation de l'invention la méthylcellulose commercialisée par la société SEPPIC sous le nom commercial Métolose SM 400 de viscosité Brookfield 4000 centipoises (2 % en eau à 20° C) et de poids moléculaire de 86000 Daltons. Le milieu selon l'invention contiendra, de préférence, de 210 à 5000 mg/l, de préférence de 1900 à 2500 mg/l, préférentiellement 2205 mg/l de méthylcellulose.

15 Les SVE utilisés permettent une hydratation des cellules par rétention d'eau et présentent une certaine adhésivité ou attachement aux cellules et tissus qu'elles entourent, assurant ainsi la protection de ces derniers contre les attaques chimiques ou les effets toxiques de l'air.

Le milieu de conservation selon l'invention contient également d'autres  
20 composants plus couramment utilisés dans le domaine de la conservation de cellules vivantes.

En particulier, le milieu de conservation contient une base aqueuse nutritive chimique, classiquement utilisée dans les milieux de conservation d'organe ou de culture cellulaire. On pourra notamment se référer à l'article « le Technoscope de  
25 biofutur », n°133, avril 1994, pages 3-16 qui indique qu'une base nutritive contient :

- des acides aminés, dont le rôle dans le métabolisme cellulaire est de fournir l'azote et le carbone. Certaines cellules, en plus des 13 acides aminés essentiels, ont des besoins spécifiques (la sérine, par exemple, pour les cellules lymphoïdes) ;
- des sucres, le glucose est le plus généralement utilisé, bien qu'il puisse être  
30 remplacé par le galactose lorsqu'il est nécessaire de limiter l'accumulation d'acide lactique ;

- des vitamines, essentiellement du groupe B, dont 8 sont considérées comme indispensables ;

- des ions, apportés sous forme de solutions salines équilibrées, qui jouent un rôle important dans le maintien du potentiel membranaire et de la pression osmotique, ce sont également les cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques ;

- des métaux présents à l'état de trace, semblent jouer un rôle de plus en plus important, en particulier lorsque la culture est réalisée en milieu défini. Les plus importants sont le sélénium, le cadmium et le lithium.

Ce type de bases peut être préparé à partir de ces différents éléments constitutifs. Certaines bases nutritives chimiques existent également dans le commerce, soit sous forme liquide, soit sous forme solide : ces dernières doivent alors être reconstituées dans l'eau. En particulier, on pourra utiliser l'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium ref : Iscove, N.N. and Melchers (1978) J. of Exp. Med. 147 : 923-933), le milieu MEM ALPHA de STAINERS, C.P. *et al.*, Nature New Biol. 230,52 (1971), le milieu de Click RPMI de Click *et al.*, Cell. Immunol. 3, 264 (1972), le milieu CMRL1066 de PARKER, R.C., *et al.* Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5, 303, (1957), le milieu Leibovitz L15 de A. LEIBOVITZ, Am. J. Hyg. 78, 173 (1963) et H.J. MORTON, In vitro, 6, 89 (1970), le milieu M199 de MORGAN, J.F. *et al.*, Proc.soc.Exp.Biol.Med.73, 1 (1950), le milieu DMEM/HAM F12, de D. BARNES and G. SATO, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), bases nourricières aqueuses qui contiennent différentes substances nécessaires au maintien des cellules et tissus, notamment différents oligoéléments, des acides aminés, des vitamines, des électrolytes, un tampon stabilisateur de pH, un indicateur de pH (par exemple, le rouge de phénol), du glucose ou du galactose (L15). Par oligoéléments, on entend tous sels inorganiques métalliques, à l'exception de NaCl, présents à l'état de trace ou en quantité plus importante.

De façon avantageuse, le milieu de conservation selon l'invention contient, donc, des acides aminés, des oligoéléments, des vitamines, des électrolytes, un tampon stabilisateur de pH, provenant en majorité de la base nutritive utilisée. Si la base utilisée ne contient pas ces éléments en quantité suffisante, ceux-ci seront complétés.

Le milieu de conservation selon l'invention contient, avantageusement, et, de façon indépendante, de 1 à 50 mg/l de sulfate de chondroïtine, de 0,1 à 25 mg/l d'héparane sulfate, de 500 à 2000 mg/l d'acide alginique, de 1000 à 10000 mg/l d'hydroxyéthylamidon.

- 5 Dans le cas, où le milieu de conservation est destiné à être utilisé sur des greffons de cornées humaines, il contiendra de préférence des composants présents dans l'humeur aqueuse tels que le lactate de sodium, l'acétate de sodium, le citrate de sodium, l'ascorbate de fer II, le gluconate de fer II, le pyruvate de sodium et le chlorure de calcium.
- 10 De façon particulièrement avantageuse, le milieu de conservation selon l'invention contient de façon indépendante ou en combinaison :
- de 0,01 à 350 mg/l de vitamines, choisies de préférence parmi celles-ci :
    - du tocophérol acétate
    - du rétinol acétate
    - 15 - de l'hydroquinone
    - de l'acide ascorbique
    - de la thiamine B1-HCL
    - de la riboflavine B2
    - du D-pantoténate de Ca B5
    - 20 - du pyridoxal HCl B6
    - de la biotine B8
    - de l'acide folique B9
    - de la cyancobalamine B12
    - de la nicotinamide B3 PP
    - 25 - de l'orotate de chrome B13
  - de 0,01 à 650 mg/l d'oligoéléments, choisis de préférence parmi ceux-ci :
    - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
    - KCl
    - $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
    - 30 -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
    - $\text{NaHCO}_3$
    - $\text{MgCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnCO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 5     -  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- $\text{H}_2\text{SeO}_3$
- $\text{NH}_4\text{VO}_3$
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 10     -  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Oxyde de Zinc
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- de 0,005 à 150 mg/l de nucléosides, choisis de préférence parmi ceux-ci :
- 15     - l'adénosine
- la cytidine
- la déoxyadénosine
- la déoxycytidine,
- la déoxyguanosine
- 20     - la guanosine
- l'uridine
- la thymidine
- de 800 à 4000 mg/l d'acides aminés,
- de 500 à 9000 mg/l d'oses, et de préférence du glucose et/ou du galactose,
- 25     • d'autres éléments, à raison de 0,001 à 75000 mg/l au total, et notamment :
  - l'acétate de sodium ( $3\text{H}_2\text{O}$ )
  - le citrate de sodium
  - le lactate de sodium
  - les pyruvates de sodium
  - 30     - le gluconate de fer II,
  - le sélénite de sodium
  - le poloxamer 188

- l'acide oléique
- l'acide linoléique
- l'acide linolénique
- l'acide palmitique
- 5 - le Tween 80.

Le milieu de conservation selon l'invention peut se présenter sous forme liquide ou semi-solide. Il présente une viscosité assez importante pour favoriser la protection des cellules. De façon avantageuse, la viscosité Brookfield du milieu de conservation selon l'invention est comprise entre 1 et 15 centipoises (cps) à 20° C,  
10 de préférence entre 2,5 et 10 cps. Le milieu de conservation selon l'invention est donc non injectable, de part sa viscosité.

L'osmolarité du milieu selon l'invention présente également une importance et est, en particulier, comprise entre 300 et 465 mOsm  $\pm$  40. L'osmolarité du milieu dépend notamment de la concentration en NaCl. Lorsque le milieu selon l'invention  
15 est destiné à la conservation ou au transport, son osmolarité sera avantageusement comprise entre 300 et 360 mOsm  $\pm$  40, lorsqu'il est destiné à la déturgescence, son osmolarité est avantageusement comprise entre 350 et 465 mOsm  $\pm$  40. L'osmolarité des milieux de conservation actuellement sur le marché est moins importante. Un des avantages de l'invention est de pouvoir proposer un seul milieu pour le transport, la  
20 conservation et la déturgescence.

Le milieu de conservation selon l'invention est préparé par mélange des différents constituants. De préférence, pour améliorer la dissolution de l'acide hyaluronique dans la base nutritive biologique liquide, ce dernier sera mélangé au chlorure de sodium, puis ajouté à la base nutritive contenant déjà la méthylcellulose.

25 Le milieu de conservation selon l'invention ne contient aucun composant d'origine animale. En effet, d'une part, contrairement à la plupart des milieux utilisés à ce jour pour la conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, le milieu selon l'invention ne contient ni sérum albumine de veau foetal, ni lactoférine, ni transférine, ni insuline, ni d'autres protéines d'origine animale.  
30 D'autre part, on utilise de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire et de la méthylcellulose, dont la synthèse ne fait intervenir aucune matière première d'origine animale. Un tel milieu de conservation pourra donc facilement être conforme à la



législation sur les produits thérapeutiques annexes définis à l'article L. 1263-1 du Code de la Santé Publique. L'utilisation d'un milieu de conservation exempt de composant d'origine animale permet d'améliorer la sécurité sanitaire des cellules conservées.

5 Le milieu de conservation selon l'invention pourra être utilisé pour la conservation, l'organoculture, la culture cellulaire, la congélation, le transport ou la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, et en particulier de cornées humaines vivantes. Le milieu de conservation selon l'invention est utilisable à des températures comprises entre  $-196^{\circ}\text{C}$  et  $37^{\circ}\text{C}$   
10 notamment.

En fonction de l'application envisagée, le milieu de conservation selon l'invention pourra subir certaines adaptations.

Par exemple, dans le cas où le milieu selon l'invention est destiné à être utilisé pour la déturgescence préopératoire, il contiendra avantageusement du poloxamer  
15 188, à raison de 200 à 75000 mg/l, préférentiellement de 450 à 50000 mg/l.

Dans le cas, où le milieu est destiné à être utilisé pour la congélation de cellules vivantes, une partie de l'eau présente dans le milieu pourra être remplacée par du diméthylsulphoxide (DMSO) ayant un effet cryoprotecteur.

Les exemples ci-après illustrent l'invention, mais n'ont aucun caractère  
20 limitatif. Dans les exemples ci-après, on utilise de l'acide hyaluronique sous forme de poudre, vendu sous le nom commercial Cristalhyal par le laboratoire Bowman (distributeur société Soliance), de la méthylcellulose commercialisée par la société SEPPIC sous le nom commercial Métolose SM 4000 et du NaCl commercialisé par la société Sigma Aldrich. Les exemples 1 à 3 (milieux de conservation) comprennent  
25 74% en volume de base IMDM et les exemples 4 à 7 (milieux de déturgescence) comprennent 88% en volume de base IMDM.

Les osmolarités sont mesurées avec un osmomètre vendu par Fischer Bioblock Scientific sous la référence M85501 (Calibration automatique zéro (eau distillée) et standard (300mOsm/kg) par pression d'une touche. Temps de réponse 1 minute).

30 Les viscosités sont mesurées avec un viscosimètre vendu par Fischer Bioblock Scientific sous la référence M57571 avec un adaptateur faible viscosité à partir de 1cps réf M57510 (Affichage simultané de la vitesse, mobile sélectionné, viscosité en

cps et en % de gamme et température. Compatible Brookfield. Les mobiles sont plongés directement dans l'échantillon).

**Exemple 1 :** Le milieu de l'exemple 1 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	NaCl	6 985 mg/l
10	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l
15	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,3
	Osmolarité	394 mOsm
20	Viscosité	5cps (Brookfield 20°C)

**Exemple 2 :** Le milieu de l'exemple 2 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

	Acide hyaluronique	
25	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
30	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l

	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,3
5	Osmolarité	372 mOsm
	Viscosité	5cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 3 :** Le milieu de l'exemple 3 est avantageusement utilisé pour le transport et la conservation.

10	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	160 mg/l
	Poloxamer 188	2 205 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
15	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l
	Vitamines	163 mg/l
20	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,3
	Osmolarité	305 mOsm
	Viscosité	1,5cps (Brookfield, 20°C)

25

**Exemple 4 :** Le milieu de l'exemple 4 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
30	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	6 985 mg/l

12

	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
5	Nucléosides	10 mg/l
	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,3
10	Osmolarité	694 mOsm
	Viscosité	10 cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 5 :** Le milieu de l'exemple 5 est avantageusement utilisé pour la déturgence.

15	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	100 mg/l
	Méthylcellulose	2 205 mg/l
	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
20	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l
25	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
	pH	7,3
	Osmolarité	585 mOsm
30	Viscosité	10 cps (Brookfield, 20°C)

**Exemple 6 :** Le milieu de l'exemple 6 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	160 mg/l
5	Dextran	50 000 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
10	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l
	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l
15	pH	7,3
	Osmolarité	595 mOsm
	Viscosité	8,5 cps (Brookfield, 20° C)

**Exemple 7 :** Le milieu de l'exemple 7 est avantageusement utilisé pour la déturgescence.

20	Acide hyaluronique	
	de haut poids moléculaire	160 mg/l
	Poloxamer 188	50 000 mg/l
	NaCl	5 585 mg/l
25	Acides aminés	1 838 mg/l
	Oligoéléments	5 390 mg/l
	Glucose	4500 mg/l
	Hydrates de carbone	1167 mg/l
	Nucléosides	10 mg/l
30	Vitamines	163 mg/l
	Esters d'acide gras	46 mg/l
	Tampon	8 982 mg/l

PH	7,3
Osmolarité	376 mOsm
Viscosité	5 cps (Brookfield, 20°C)

## 5 MATERIEL ET METHODE

### Déroulement de la conservation

Les cornées humaines scientifiques (dons du corps à la science) sont prélevées dans les 24 heures suivant le décès du donneur. Les donneurs ne doivent pas avoir subi de chirurgie intra oculaire, afin de conserver la comparabilité des deux cornées, d'un même donneur. Lors du prélèvement, chaque cornée d'une même paire est immergée dans 50 ml d'un milieu de transport. Il s'agit soit du milieu de référence (Inosol®, Chauvin-Opsia/Bausch and Lomb, Toulouse, France) soit d'un milieu selon l'invention (exemples 1 à 3). Les flacons étanches contenant les cornées sont immédiatement placés en étuve sèche à 31°C. Au deuxième jour de conservation en oragnoculture, la densité cellulaire endothéliale (DCE) est mesurée selon une procédure décrite plus loin. La cornée est ensuite replongée dans un nouveau flacon de 100 ml du même type de milieu, suspendue à un fil de suture afin d'éviter les contact avec les parois et les sédiments déposés au fond du flacon. Au quatorzième jour de conservation, les cornées sont transférées dans un nouveau flacon de 100 ml. Au trentième jour de conservation, durée correspondant au maximum préconisé en Europe, une nouvelle mesure de la DCE est réalisée et la perte cellulaire calculée pour la période dite de conservation. La cornée est ensuite immergée dans 50 ml de milieu dit "de déturgescence" destiné à réduire son épaisseur. Il s'agit d'Exosol® (Chauvin-Opsia/Bausch and Lomb) ou d'un milieu selon l'invention (exemples 4 à 7) correspondant avec 50 000 mg/l de DEXTRAN ou 50 000 mg/l de Poloxamer 188. Quarante huit heures après, les deux cornées de la même paire sont photographiées posées côte à côte sur un réseau de 8 traits noirs d'épaisseur croissante et rétro éclairé. Cette photographie sert à l'appréciation de la transparence cornéenne. L'épaisseur cornéenne est mesurée à l'apex par pachymétrie ultrasonore (Tomey AL-2000, Tokyo, Japon). Une troisième mesure de la DCE est réalisée, cette fois après incubation pendant 45 secondes avec du rouge alizarine (Sigma) 4% dans du tampon

phosphate pH 4,5 destiné à colorer les membranes cellulaires. Cette coloration non vitale ne peut être utilisée qu'en fin de conservation en raison de sa toxicité cellulaire.

L'ensemble de la procédure est effectuée à l'aveugle concernant la nature du milieu de conservation.

5

#### **Procédure de respect de l'analyse en aveugle**

Les deux milieux de conservation et de déturgescence sont conditionnés dans les mêmes contenants (flacon Nalgène 125 ml) et numérotés par une personne ne prenant part, ni à la conservation, ni aux déterminations de DCE. Un système de numérotation d'après une liste de randomisation rend non prévisible l'attribution des milieux en fonction des numéros portés sur les flacons.

#### **Procédure de mesure de la DCE**

Après rinçage de la cornée au BSS (« Balanced Salt Solution », Alcon, Kaysersberg, France), l'endothélium est recouvert pendant 1 minute par du bleu trypan 0,4% (Sigma), puis rincé pendant 4 minutes avec du chlorure de sodium 0,9%. L'endothélium cornéen est alors observé au grandissement x10 sous microscope optique couplé au prototype d'analyseur de la mosaïque endothéliale décrit par Gain P. *et al.* dans Br J Ophthalmol 2002, 86, pages 306-11 et 531-6. Dix images de zones distinctes de l'endothélium sont saisies et archivées sur disque dur pour une analyse différée. Cette analyse porte à chaque fois sur plus de 300 cellules.

### **RESULTATS**

#### **Caractéristiques des donneurs**

Il s'agit de 6 femmes et 10 hommes dont l'âge est compris entre 57 et 90 ans, avec un âge moyen de 74,4 ans. Le délai entre décès et prélèvement est compris entre 4,5 à 44 heures, avec un délai moyen de 20 heures.

#### **Résultats**

	milieux	Exemple 1 (conservation)
	Opsia	Exemple 4 (déturgescence)
DCE en début de conservation (J2)	1814	1848
DCE en fin de conservation (J30)	1600	1693

perte cellulaire (%)	- 11,8	- 8,4
DCE post déturgescence	1300	1542
perte cellulaire post déturgescence (%)	-18,7	-8,9
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	703	717

Perte totale en % : milieux Opsia : 30,5 et milieux des exemples 1 et 4 selon l'invention : 17,3

	milieux Opsia	Exemple 2 (conservation) Exemple 5 (déturgescence)
DCE en début de conservation (J2)	1373	1392
DCE en fin de conservation (J30)	1280	1300
perte cellulaire (%)	- 6,8	- 6,7
DCE post déturgescence	980	1163
perte cellulaire post déturgescence (%)	-23,4	-10,5
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	723	716

Perte totale en % : milieux Opsia : 30,2 et milieux des exemples 2 et 5 selon l'invention : 17,2

	Milieux Opsia	Exemple 3 Exemple 6
DCE en début de conservation (J2)	2441	2190
DCE en fin de conservation (J30)	2239	2090
perte cellulaire (%)	- 8,3	- 4,6
DCE post déturgescence	1573	2255
perte cellulaire post déturgescence (%)	- 29,7	- 3
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	797	950

Perte totale en % : milieux Opsia : 38 et milieux des exemples 3 et 6 selon l'invention : 7,6



	Milieux Opsia	Exemple 3 Exemple 7
DCE en début de conservation (J2)	2788	2602
DCE en fin de conservation (J30)	2239	2370
perte cellulaire (%)	- 29,4	- 8,9
DCE post déturgescence	1928	2088
perte cellulaire post déturgescence (%)	- 2,1	- 11,9
épaisseur cornéenne après déturgescence (µm)	755	832

Perte totale en % : milieux Opsia : 31,5 et milieux des exemples 3 et 7 selon l'invention : 20,8

5

## DISCUSSION

Au terme de cette étude, les inventeurs ont mis au point un milieu défini sans composant d'origine animale capable d'assurer sur 30 jours une survie endothéliale significativement supérieure à celle obtenue avec le milieu de référence utilisé dans les banques de cornées. Ce point est primordial car un capital supplémentaire en cellules endothéliales de près de 16,9% en moyenne est obtenu, ce qui se traduit par une amélioration spectaculaire de la qualité de la conservation. Un tel gain permettrait au receveur d'avoir une réserve endothéliale supérieure à ce qu'il était possible de lui assurer jusqu'à présent. Cette réserve signifie pour lui une meilleure résistance aux événements intercurrents (traumatismes, rejets immunologiques, chirurgie endoculaire) et également un allongement de la durée pendant laquelle le greffon reste transparent.

Le poloxamer 188 semble moins cytotoxique que le dextran d'après les résultats obtenus.

20

## REVENDICATIONS

1 - Milieu de conservation d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes contenant une base nutritive liquide, caractérisé en ce qu'il contient un acide hyaluronique de haut poids moléculaire et du chlorure de sodium et en ce qu'il ne  
5 contient aucun composant d'origine animale.

2 - Milieu de conservation selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il contient :

- de 80 à 4000 mg/l, de préférence 100 à 200 mg/l, préférentiellement 100 à 160 mg/l d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, et
- 10 - de 4500 à 9000 mg/l, de préférence de 5500 à 9000 mg/l, préférentiellement 7000 mg/l de chlorure de sodium.

3 - Milieu de conservation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, du poloxamer 188.

4 - Milieu de conservation selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il  
15 contient de 200 à 75000 mg/l, de préférence de 450 à 50000 mg/l de poloxamer 188.

5 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il contient, en outre, de la méthylcellulose.

6 - Milieu de conservation selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient de 210 à 5000 mg/l, de préférence de 1900 à 2500 mg/l et préférentiellement  
20 2205 mg/l de méthylcellulose.

7 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il présente une osmolarité de 300 à 465 mOsm  $\pm$  40 mOsm.

8 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il présente une viscosité Brookfield à 20°C comprise entre 1 et 15 centipoises, de  
25 préférence entre 2,5 à 10 centipoises.

9 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il contient des oligoéléments, des acides aminés, des vitamines et un tampon stabilisateur de pH.

10 - Milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce  
30 qu'il ne contient pas de dextran.

11 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 10 pour la conservation de cornées humaines vivantes.

12 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 10 pour l'organoculture d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

13 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 10  
5 pour le transport d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.

14 - Utilisation d'un milieu de conservation selon l'une des revendications 1 à 10 pour la déturgescence d'organes, de tissus biologiques ou de cellules vivantes, en particulier de cornées humaines vivantes.